

ABSTRACTED-PUB-NO: JP 62244398A

BASIC-ABSTRACT: The DNA and/or the RNA is based on a carrier. The DNA and/or the 10A is degenerated into a single stranded DNA and/or RNA. Alternatively the DNA and/or the RNA is previously degenerated into a single stranded DNA and/or RNA. The single stranded DNA and/or RNA is then based on a carrier. A probe consisting of polyinosine, polydeoxyinosine, oligoinosine and/or oligodeoxyinosine is labelled. The single stranded DNA and/or RNA and the labelled probe are hybridised. The existence of the DNA and/or the RNA in the prod. to be examined is detected by detecting the label on the carrier.

USE/ADVANTAGE - The method is applicable to detect the presence or the absence of malignant tumour. The method precisely detects quantities of DNA and/or RNA in the prod. to be examined with simple operation. Employing polyinosine, polydeoxyinosine, oligoinosine, oligodeoxyinosine as a probe precisely detects or quantitates the presence or the absence of malignant tumour.

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0

TITLE-TERMS:

DETECT DNA RNA CONVERT SINGLE STRAND FORM PROBE CONTAIN LABEL INOSINE
DERIVATIVE

ADDL-INDEXING-TERMS:

DEOXYRIBONUCLEIC RIBONUCLEIC ACID

DERWENT-CLASS: B04 D16 K08 S03

CPI-CODES: B04-B04A1; B04-C02A; B05-A04; B11-C07B5; B12-K04A1; D05-H10;
D05-H12; K09-B; K09-E;

EPI-CODES: S03-E14H;

CHEMICAL-CODES:

Chemical Indexing M1 *01*

Fragmentation Code

M423 M750 M903 N102 Q233 V753

Registry Numbers

87140 1286M

Chemical Indexing M1 *02*

Fragmentation Code

B615 C053 C101 C106 C116 C811 M423 M781 M903 N102

P831 Q233 Q444 V753

Registry Numbers

87140 1286M

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-244398

⑬ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和62年(1987)10月24日

C 12 Q 1/68
G 01 N 33/50

A-8412-4B
P-8305-2G

審査請求 未請求 発明の数 1 (全11頁)

⑮ 発明の名称 DNAおよび／またはRNAの検出方法

⑯ 特 願 昭61-87368

⑰ 出 願 昭61(1986)4月16日

⑱ 発 明 者 桔 梗 谷 正 大阪市淀川区田川2丁目3番6号 411

⑲ 出 願 人 積水化学工業株式会社 大阪市北区西天満2丁目4番4号

明 細 書

1. 発明の名称

DNA および／またはRNA の検出方法

2. 特許請求の範囲

1. 生体由来の検体中に含有されるDNA および／またはRNA の検出方法であって、以下の工程、

(a) 生体由来の検体中に含有されるDNA および／またはRNA を担体に担持させた後、該DNA および／または該RNA を変性させ一本鎖DNA および／またはRNA とする工程、あるいは生体由来の検体中に含有されるDNA および／またはRNA をあらかじめ変性させ一本鎖DNA および／またはRNA とした後、担体に担持させる工程、

(b) ポリイノシン、ポリデオキシイノシン、オリゴイノシン、および／またはオリゴデオキシイノシンから成るプローブをラベル化する工程、

(c) 該(a)工程で得られた一本鎖DNA および／またはRNA と該(b)工程で得られたラベル化プローブとをハイブリダイズさせる工程、および

(d) 該担体上のラベルを検出することにより該検

体中のDNA および／またはRNA の存在を検出する工程、

を含有するDNA および／またはRNA の検出方法、

2. 前記検体が生体由来の水溶液または懸濁液である特許請求の範囲第1項に記載の検出方法、

3. 前記プローブのラベル化が³H、¹⁴C、³²P、³³S、¹²⁵I、および¹²⁵I等である群から選択される少なくとも一種を含有する放射性物質を用いて行われる特許請求の範囲第1項に記載の検出方法、

4. 前記プローブのラベル化が蛍光物質、化学発光物質および免疫蛍光物質である群から選択される少なくとも一種を用いて行われる特許請求の範囲第1項に記載の検出方法、

5. 前記プローブのラベル化が酵素を用いて行われる特許請求の範囲第1項に記載の検出方法、

6. 前記プローブのラベル化が化学反応を用いて行われる特許請求の範囲第1項に記載の検出方法、

7. 前記担体がニトロセルロース、ジアゾベンジルオキシメチルセルロース(DBM)、ジアゾメタ

アミノベンジルオキシメチルセルロース、またはナイロンでなるフィルター、薄膜または織物である特許請求の範囲第1項に記載の検出方法。

8. 前記オリゴマーブロープの重合度が10量体以上である特許請求の範囲第1項に記載の検出方法。

9. 前記オリゴマーブロープの重合度が15量体以上である特許請求の範囲第8項に記載の検出方法。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は生体由来の検体中に含有されるDNA および／またはRNA の検出方法、特にポリイノシン、ポリデオキシイノシン、オリゴイノシン、および／またはオリゴデオキシイノシンをブロープとして利用し、これと検体中のDNA および／またはRNA とのハイブリダイゼーションにより検体中のDNA および／またはRNA を検出する方法に関する。

(従来の技術)

生体由来の検体中のDNA および／またはRNA を

変性させてこれを一本鎖とする条件で処理する。次に、これに³²P等でラベル化されたB型肝炎ウイルス由来のDNA ブロープを作用させる。検体中にB型肝炎ウイルスが存在すれば、該ウイルスの変性された一本鎖DNA に上記DNA ブロープがハイブリダイズする。そこで、担体上のラベルをオートラジオグラフィや液体シンチレーションカウンター等で検出することにより、担体に担持された検体中のB型肝炎ウイルス由来のDNA、言い換えれば、検体中のB型肝炎ウイルスの存在の有無が確認される。

また、特開昭58-130,000号公報には、個体によって5種類の型が存在するHLA(ヒト白血球抗原)の型を判定する方法が開示されている。この判定法も上記方法と同様の原理で行われ、既知の型のHLAのDNA ブロープが用いられる。検体中に該ブロープDNA に対応するHLAの一本鎖DNA が存在すればハイブリダイゼーションが生じる。そのため容易にHLA型を判定することができる。ブロープとしては、約1,000～1,200ヌクレオチドの

検出する方法は現在のところ、抗原抗体反応を利用した方法が主流である。この方法によれば、自己免疫疾患患者の血液中に存在する抗DNA抗体を放射性ヨウ素化合物等でラベル化し、これを用いて検体、例えば血清中のDNA濃度を測定することができる(Davis G.L. et al., Arthritis Rheum, 16,52(1973))。しかし、この抗DNA抗体を利用する方法は、抗DNA抗体が自己免疫疾患患者の血清中にのみ存在し、大量に再現性よく入手することが困難であること、およびその測定感度が低い等の問題点があった。

一方、特定の限定された種類のDNAの検出方法が、DNAブロープ法として特開昭58-170,496号公報および特開昭58-130,000号公報に開示されている。

特開昭58-170,496号公報に開示された方法は、血清中のB型肝炎ウィルスを、そのDNAを検出することにより、検出する方法である。この方法によれば、まず検体の血清に含まれるDNAをニトロセルロースフィルター等に担持させた後、DNAを

長鎖の一本鎖DNAが用いられるため、正確にHLA型を判定することが可能である。

しかし、これらのDNAブロープ法は元来、特異性の高い分析法であり、非特異的な結合は生じにくい。従って、特定の限定された種類のDNAを精度良く検出することはできるが、血中のDNAのような由来の不明なDNAを検出することはできない。

最近、Davis G.L.らにより悪性腫瘍患者の血清にDNAが大量に存在することが報告されている(Arthritis Rheum, 16,52(1973))。Shapiro B.らは、悪性腫瘍患者血清中のDNA量は平均270ng/mlであり、この値は健常人が平均100ng/ml以下であるのに比べて高いことを報告している(Cancer, 51, 2116(1983))。このような悪性腫瘍患者における血中DNA濃度の上昇の機序については、次のような仮説がたてられている。Leon S.A.らは、悪性腫瘍患者の血液中のDNA分解酵素(DNase)の活性が低いことを報告している(Europ. J. Cancer, 17(6), 533(1981))。このようにDNaseの活性が低いため、DNAが血液中に溶出すると、健常人の場

合はDNaseによりDNAが分解されるが、悪性腫瘍患者の場合はDNAが分解されずに血液中に残留、蓄積され、DNA濃度が上昇する。血清中に存在するDNAのほとんどは、悪性腫瘍細胞や、リンパ球等の正常細胞がウイルスや悪性腫瘍細胞との相互作用により変化した異常細胞に由来すると考えられる。しかし、そのDNAの形態(鎖長、二本鎖で存在するのか一本鎖で存在するのか、また、特異的な配列が存在するのか)については知られていない。

そこで、B型肝炎ウイルスDNA等特異な種類のDNAだけではなく、一般的なDNAの簡単な検出方法があれば、癌の早期発見に役立つものと思われる。

ちなみに、現在実用化されている悪性腫瘍を検出する方法には、血中の α -フェトプロテインや癌胎児性抗原(Carcino-embryonic antigen, CEA)等の胎児性蛋白質を検出する方法がある。 α -フェトプロテインは胎児体内で成人におけるアルブミンの代わりに合成される蛋白質であり、健康人

には存在しない。しかし、肝臓癌患者の血液中には α -フェトプロテインが存在する。従って α -フェトプロテインを測定することにより肝臓癌の病状経過、治療効果、予後などの判定が可能となる。また、癌胎児性抗原を測定すれば、大腸、結腸、および他の消化器の癌の存在を知ることができる。

しかし、これらの癌の検出法は、上記の種類の癌のみが検出可能であり、一般的な癌の検出方法とはならない。また、癌患者によっては上記 α -フェトプロテインや癌胎児性抗原が低い値を示すため、癌鑑別法としての精度が高いとはいえない。(発明が解決しようとする問題点)

本発明は上記従来の欠点を解決するものであり、その目的とするところは、生体由来の検体中に含有されるDNAおよび/またはRNAを簡単な操作で精度良く検出および定量できる方法を提供することにある。

本発明の他の目的は、DNAおよび/またはRNAのプローブを利用して、生体由来の検体中に含有

され由来や形態が未知のDNAおよび/またはRNAを容易に検出および定量する方法を提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、血清等の体液中に存在するDNAを、容易にかつ安価に入手しうる検出試薬としてのプローブを用いて簡単に検出、定量し、悪性腫瘍の有無の判定基準とすることが可能なDNAの検出方法を提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、細胞中のRNAを、容易にかつ安価に入手しうる検出試薬としてのプローブを用いて簡単に検出、定量し、DNAからRNAへの転写効率を、言い換えれば、遺伝子の発現効率を測定することが可能なRNAの検出方法を提供することにある。

(問題点を解決するための手段)

上記目的を達成するため、本発明のDNAおよび/またはRNAの検出方法は、以下の工程、(a)生体由来の検体中に含有されるDNAおよび/またはRNAを担体に担持させた後、該DNAおよび/または該RNAを変性させ一本鎖DNAおよび/またはRNAと

する工程、あるいは生体由来の検体中に含有されるDNAおよび/またはRNAをあらかじめ変性させ一本鎖DNAおよび/またはRNAとした後、担体に担持させる工程、(b)ポリイノシン、ポリデオキシイノシン、オリゴイノシン、および/またはオリゴデオキシイノシンから成るプローブをラベル化する工程、(c)該(a)工程で得られた一本鎖DNAおよび/またはRNAと該(b)工程で得られたラベル化プローブとをハイブリダイズさせる工程、および(d)該担体上のラベルを検出することにより該検体中のDNAおよび/またはRNAの存在を検出する工程、を含有する。

一般的にイノシンは、tRNAにおけるアンチコドンの第3番目(5'側)に存在し、いわゆる“wobble”(ゆらぎ)の現象に関与している。アンチコドン中のイノシンは、mRNAのアデニン(A)、シトシン(C)、ウラシル(U)、のいずれとも水素結合を形成すると考えられている(Watson J.D., Molecular Biology of the Gene(1975))。しかしながら、グアニン(G)とはほとんど水素結合を

形成しないことも知られている。従って、単純にイノシンのポリマーあるいはオリゴマーであるポリイノシンあるいはオリゴイノシン、さらにまた、そのデオキシ体であるポリデオキシイノシンやオリゴデオキシイノシンをハイブリダイゼーションのプロープとして用いた場合、G との不整合により他の水素結合が妨げられ、良好なハイブリッドを形成するとは考えにくく、現在までその様な試みはなされていなかった。

しかしながら、このプロープと検体中のDNA および／またはRNA とをハイブリダイズさせることにより検体中のRNA および／またはRNA が容易に検出されうる、という発明者の知見に基づいて本発明方法は完成された。

従来良好なハイブリッドを形成しにくいと考えられていたイノシン系のポリマーまたはオリゴマーが検体中のDNA および／またはRNA とハイブリッドを形成しうる理由としては、次のようなことが考えられる。DNA および／またはRNA の塩基組成はA, G, C, およびT (RNAの場合にはU) から成っ

ている。イノシンはC と強く、次いでT (またはU) と比較的強く、A とは弱く、そしてG とは非常に弱く水素結合を形成する。(G の場合には逆にその立体障害のため返って反発しあう。) ここで、G のみを構成成分とするDNA および／またはRNA は人工のものに限られ、従って完全に反発ししかない様なDNA および／またはRNA は基本的に有り得ないと考えられる。また、DNA は二本鎖となっているため、一方の鎖がたとえG 含有量が高いとしても、その相補鎖には必然的にC 含有量が多いことになる。従って、G 含有量の高い鎖にはポリまたはオリゴ(デオキシ)イノシンはハイブリダイズしにくくとも、その相方のC 含有量の高い鎖にはイノシンは返ってハイブリダイズし易くなる。その結果、平均化されて全体的には良くハイブリダイズすることとなる。RNA は一本鎖の場合が多いため、上記のような理由は考えにくい。しかしながら、DNA-RNA やRNA-RNA のハイブリッドの場合はその水素結合がDNA-DNA のハイブリッドの場合より強固であり、一般に T_m が高いことが知られ

ているので、たとえG 含有量が多い場合でも、DNA の場合とくらべ比較的強くハイブリダイズするのかもしれない。

本発明方法によりDNA および／またはRNA を検出する場合には、先ず、DNA および／またはRNA を含有する生体由来の検体を担体に担持させる。例えば、血清を検体として担体にスポットしそれに含まれるDNA を担持させる。上記担体上に担持されたDNA は煮沸もしくはアルカリ処理により一本鎖のDNA に変性される。RNA は多くの場合、一本鎖として存在するため、通常、変性処理を必要としないが、部分的に折れ曲がって水素結合を形成している場合もあるので、必要に応じて変性処理がなされる。RNA はアルカリにより容易に分解するため、変性処理は煮沸により行うのが好ましい。あらかじめ変性処理を行なった一本鎖のDNA および／またはRNA を担体に担持させてもよい。

ここで使用される担体の素材としては、DNA やRNA を吸着しやすいニトロセルロース、ナイロン、ジアゾベンジルオキシメチルセルロース(DBM)、

およびジアゾメタアミノベンジルオキシメチルセルロース等があり、担体の形状はフィルター状、薄膜状、および織物状等が使用されうる。例えば、0.2~0.45 μm の孔径を有するニトロセルロースやナイロンフィルター(例えばゼータ・プロープTM、バイオラッド社製)が好適に用いられる。この他にラテックス等の微球体を担体として利用することも可能である。

次に、プロープの調整を行う。高分子量のプロープとしては、PL バイオケミカルズ社製のポリイノシン(poly(iI)) および／あるいはポリデオキシイノシン(poly(dI)) をそのまま用いてもよいし、または、それらのモノマーであるイノシンジホスフェート(IDP)やデオキシイノシンジホスフェート(dIDP)をポリヌクレオチドフォスホリラーゼにより重合して合成してもよい。一方、オリゴマー型の低~中分子量のオリゴイノシンやオリゴデオキシイノシンについては、上記の高分子量のポリイノシンやポリデオキシイノシンをヌクレアーゼにより部分加水分解したものを用いて

もよいし、あるいはまた、イノシンあるいはデオキシイノシンを用いて近年実用的になってきている自動DNA合成機あるいはRNA合成機により化学的に合成してもよい。後者の場合、その分子量（重合度）を厳密に制御できるため有用である。

このようにして得られたプローブは次いで放射性物質等を用いてラベル化する。ラベル化するには、通常、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、および ^{131}I 等を含有する放射性物質によるラベル化法が利用される。この放射性物質によるラベル化法では、 ^{32}P を用いたエンドラベル法が好適に用いられる。この場合には、DNAは $10^7 \sim 10^8$ cpm/ μg にラベルされ、後述のハイブリダイゼーションにより検体中のDNAをpg (10^{-12} g)の単位で検出することが可能となる。この他にも、蛍光物質、化学発光物質、免疫蛍光物質、酵素等を用いてラベル化が行われうる。蛍光物質、酵素等を用いたラベル化法は、例えば、プローブにビオチンを結合しておき、後述のハイブリダイゼーション後に蛍光物質や酵素を結合させたアビジンをこれに作用させ、

ビオチンにアビジンを結合させて発光、発色等により検出する方法である。また、ラベル化されたDNAおよび/またはRNAをリガーゼ等の酵素により本プローブに結合することによってもラベル化は可能である。あるいはまた、化学反応により、プローブを直接ラベル化してもよい。

ラベル化した後に、このラベル化プローブをより完全に一本鎖とするために変性処理を行ってもよい。

次に、担体上の一本鎖DNAおよび/またはRNAに上記のラベル化プローブを含むハイブリダイゼーション溶液を作用させ、一本鎖DNAおよび/またはRNAとプローブとをハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションに先立ち、一本鎖DNAおよび/またはRNAは、通常、プレハイブリダイゼーション溶液で処理される。プレハイブリダイゼーション溶液およびハイブリダイゼーション溶液は水溶液であってもホルムアミドなどの有機溶媒を含有する溶液であってもよい。プレハイブリダイゼーション溶液の組成の例を表1（水溶液）お

よび表3（有機溶媒系溶液）に、そしてハイブリダイゼーション溶液の組成の例を表2（水溶液）および表4（有機溶媒系溶液）に示す。ここで1xSSCとは、NaClが0.15M、そしてクエン酸ナトリウム（pH7.0）が0.015 Mの割合で含有されることを示す。

表1 プレハイブリダイゼーション水溶液

3xSSC	
NaCl	0.45M
クエン酸ナトリウム(pH 7.0)	0.045M
デンハート溶液	
ポリビニルピロリドン	0.02%
フィコール	0.02%
牛血清アルブミン	0.02%
酵母tRNA	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

表2 ハイブリダイゼーション水溶液

4xSSC	
NaCl	0.6M
クエン酸ナトリウム(pH 7.0)	0.06M
デンハート溶液	
ポリビニルピロリドン	0.02%
フィコール	0.02%
牛血清アルブミン	0.02%
酵母tRNA	200 $\mu\text{g}/\text{mL}$
^{32}P -ラベル化プローブ	$>10^5$ cpm/ mL

表3 有機溶媒系プレハイブリダイゼーション溶液

ホルムアミド	50%
5xSSC	
NaCl	0.75M
クエン酸ナトリウム(pH 7.0)	0.075M
デンハート溶液	
ポリビニルピロリドン	0.02%
フィコール	0.02%
牛血清アルブミン	0.02%
リン酸ナトリウム(pH 6.5)	25mM
SDS	0.1%
酵母tRNA	100 μ g/ ml
グリシン	1%

表4 有機溶媒系ハイブリダイゼーション溶液

ホルムアミド	50%
5xSSC	
NaCl	0.75M
クエン酸ナトリウム(pH 7.0)	0.075M
デンハート溶液	
ポリビニルピロリドン	0.02%
フィコール	0.02%
牛血清アルブミン	0.02%
リン酸ナトリウム(pH 6.5)	25mM
SDS	0.1%
酵母tRNA	200 μ g/ ml
グリシン	1%
32 P-ラベル化プローブ	$>10^5$ cpm/ml

プレハイブリダイゼーション溶液およびハイブリダイゼーション溶液はほぼ中性である。これら溶液のイオン強度を調整するために、主として、塩分、デンハート溶液およびtRNAが含まれる。ここで、デンハート溶液とは、ポリビニルピロリドン、フィコール、および牛血清アルブミンを各々0.02%ずつ含む水溶液のことである。このデンハート溶液およびtRNAは、変性された一本鎖DNAやRNAが担体に非特異的に結合するのを防ぐ働きをする。プレハイブリダイゼーション溶液およびハイブリダイゼーション溶液には、このほかに、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)等の界面活性剤が0.1~0.5%の割合で含有されていてもよい。

プレハイブリダイゼーションはpH 6~9の中性条件下で、30~75℃で1~48時間にわたって行われる。プレハイブリダイゼーション溶液として水溶液を用いる場合には35~70℃で、そして有機溶媒を一部含有する溶液を用いる場合には比較的高いイオン強度下で30~50℃にて、プレハイブリダイゼーションを行うのが効果的である。プレハイ

ブリダイゼーションの目的は、非特異的な吸着を示す可能性のある部分をあらかじめブロックさせることにある。従ってラベル化プローブを含まないこと以外は、ハイブリダイゼーションの条件に準じて行うことができる。また、プレハイブリダイゼーションの時間を長く(2時間以上)すると、バックグラウンドの少ない、コントラストのきれいな(S/N比の良好な)データが得られる。

ハイブリダイゼーションは、pH 6~9の中性条件下で、30~75℃で2~48時間にわたって行われる。ハイブリダイゼーション溶液として水溶液を用いる場合には30~70℃で、そして有機溶媒を一部含有する溶液を用いる場合には比較的高いイオン強度下で30~50℃にて、ハイブリダイゼーションを行うのが効果的である。水溶液を用いる場合には、上記温度範囲内であって、かつ、生成ハイブリッドの溶解温度よりも5~10℃程度低い温度で行われる。

一本鎖DNAおよび/またはRNAを担持させた担体をハイブリダイゼーション溶液中でインキュベ

ートすると、プローブに対応する相補的な塩基配列を有する一本鎖DNA および／またはRNA が担体上に存在すれば、C-I, T-I (RNA の場合にはU-I), および若干弱くA-I, 更に非常に弱くG-I の結合が水素結合により形成されて、プローブを構成する塩基配列の全部もしくはその一部が捕捉され、ハイブリッドが生成する。

担体上に上記結合以外に非特異的に吸着されたプローブを洗浄により除去し、乾燥後、担体上のラベルを検出することにより検体中の特異的な塩基配列、言い換えれば、検体中のDNA および／またはRNA の存在が確認される。プローブが放射性物質によりラベル化されている場合には、例えば、オートラジオグラフィにより検出される。上記乾燥後の担体を -70°C に保ち、オートラジオグラフィにかけると、例えば ^{32}P の β 崩壊によりX線フィルムが感光するため、プローブが捕捉された部分が感光して黒化する。このX線フィルムを目視観察すると、検体をスポットした部分が黒くX線フィルム上に見出される。黒化の度合を例え

ばデンストメーターにより測定することにより、検体中のDNA および／またはRNA の量を算出することが可能である。感光部分に対応する担体を裁断して液体シンチレーションカウンター等で計測することにより、検体中のDNA および／またはRNA を定量することもできる。

なお、DNA および／またはRNA の混合物からDNA もしくはRNA の一方を検出もしくは定量する場合には、あらかじめ超遠心分離法などによって分離するか、DNase やRNase で処理し、目的としない他方を分解しておけばよい。

本発明方法によれば、ポリイノシン、ポリデオキシイノシン、オリゴイノシン、およびオリゴデオキシイノシンをプローブとして利用するため、検体中に含有されるDNA および／またはRNA を簡単な操作で精度良く検出することができる。従来の抗DNA 抗体を用いたRIA 法によれば検体中のDNA の検出下限は $25\text{ng}/\text{ml}$ であるのに対して、本発明方法によれば1スポット当たり、 0.1ng 以下の量でも検出が可能である。従って1スポット当たり

のスポット量が $100\mu\text{l}$ であるとすれば $1\text{ng}/\text{ml}$ の濃度まで検出が可能である。従って、本発明方法を用いれば、血清中のDNA を精度良く検出、定量することができ、そのため、悪性腫瘍の存在の有無を簡単な操作でしかも精度良く検出することができる。また、本発明方法により、細胞中のRNA を検出、定量すれば、DNA からRNA への転写効率を、言い換えれば、遺伝子の発現効率を測定することが可能となる。例えば、生体中のインシュリンの産生量を測定する場合に、最終産物であるインシュリンの量の測定に替えて、RNA を測定することによりインシュリン産生遺伝子の発現効率をチェックすることができる。

(以下余白)

(実施例)

以下に、本発明を実施例に従って詳細に説明する。

実施例1：ポリデオキシイノシン (poly (dI)) プローブ法によるDNA の検出

(A) ポリデオキシイノシン (poly (dI)) の5'-脱リン酸化：

PLバイオケミカルズ社製ポリデオキシイノシン (poly (dI)) $10\mu\text{g}$ を、 20mM トリス-塩酸緩衝液 ($\text{pH}8.0$) およびアルカリフォスファターゼ 0.5 ユニットを含む水溶液 $100\mu\text{l}$ 中で 60°C で2時間反応させて、5'-位を脱リン酸化した。次いで、これをフェノール抽出して含有される蛋白質を除去した後、 3M NaCl $10\mu\text{l}$ 、およびエタノール $250\mu\text{l}$ を加え、エタノール沈澱を行なった。沈澱した5'-脱リン酸化poly (dI) を真空乾燥した後、 $100\mu\text{l}$ の水に溶解した。

(B) 5'-脱リン酸化ポリデオキシイノシン (poly (dI)) のラベル化：

本実施例(A) 項で得られた5'-脱リン酸化poly

(d1) 100ng を、50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH8.0)、10mM $MgCl_2$ 、0.1mM スペルミジン、5 μCi の ($r-^{32}P$) ATP (5,000 Ci/mmol)、0.1mM EDTA、10mM ジチオスレイトール、およびポリヌクレオチド キナーゼ 2 ユニット、を含む合計 100 μl の系で、37℃、1 時間インキュベートした。次いで EDTA を最終濃度 50mM となるように加えて反応を停止させた。これをフェノール抽出して含有される蛋白質を除去し、10mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.5) および 1mM EDTA を含む水溶液 (TE 緩衝液) であらかじめ平衡化したセファデックス G100 カラム (10mm \times 120mm) を用いて、TE 緩衝液でゲル濾過により精製した。この様にして poly (d1) は 1 μg 当たり 5×10^7 cpm にラベル化された。

(C) DNA の検出:

すい臓癌患者、胃癌患者、直腸癌患者、肺癌患者、および健常人の静脈血を 10 μl ずつ採取し、試験管に入れ室温で凝固させた。遠心分離機を用い、3,000rpm で分離させて血清を得た。この血清をフェノール抽出して除蛋白質を行なった後、そ

れぞれ 10 μl ずつ担体 (ニトロセルロースフィルター、孔径 0.45 μm) に円形となるようにスポットした。このフィルターを次いで、存在する DNA を変性させるために、0.5N NaOH を含むワットマン 3MM 濾紙上に、スポット面を上にして載置し、室温で 2~5 分間放置した。次いでフィルターを 1M トリス-塩酸緩衝液 (pH7.5) を含浸させたワットマン 3MM 濾紙上に移して 5 分間中和した。続いてフィルターを 1.5M NaCl-1M トリス-塩酸緩衝液 (pH7.5) を含浸させたワットマン 3MM 濾紙上に移し、5 分間放置し、その後室温にて風乾させた。次いでフィルターを、80℃で 2 時間加熱乾燥させた。次に、上記加熱乾燥後のフィルターと表 1 に示すプレハイブリダイゼーション溶液 10 μl とを熱密封できるプラスチック袋に入れ密封後、65℃で 4 時間インキュベートした。

本実施例 (B) 項で得られたラベル化された poly (d1) (以下、ラベル化プローブ DNA と称す) 約 500 μl を、100℃で 5 分間煮沸後、氷水で急冷して変性させた。この様にして得られたラベル化プロ

ーブ DNA を用いて表 2 に示すハイブリダイゼーション溶液を調整した。

プレハイブリダイゼーション溶液を袋から除き、代わりに上記ハイブリダイゼーション溶液 10 μl を加えた。袋を再び密封し 37℃で一晩インキュベートした。ハイブリダイゼーション溶液を除去しフィルターを袋から取り出し、3xSSC - 0.1% SDS 溶液で 37℃にて 4 回洗浄し、非特異的吸着物あるいは結合物を除去した。このフィルターを乾燥し、増感紙を用い、-70℃で一晩オートラジオグラフィを行い、X 線フィルムを翌日現像した。

癌患者の血清をスポットした部分はすべて黒色となり、陽性と判定された。他方、健常人の血清をスポットした部分はすべてほとんど変化が認められず、陰性と判定された。

別に、ヒト胎盤から抽出された既知量のヒト DNA を含むサンプルをスポットして、ハイブリダイゼーションによるラベル量を液体シンチレーションカウンターで計測した。その結果を表 5 に示す。この結果から検量線を作成した。

上記癌患者および健常人の血清のスポット部分のハイブリダイゼーション後のラベル量を液体シンチレーションカウンターで計測した。非スポット部分についても計測し、これをブランクとしてさし引き、得られた値と上記検量線とから血清中の DNA 濃度を算出した。その結果を表 6 に示す。表 6 から、癌患者の血清中 DNA 濃度は健常人に比べて明らかに高いことが判明した。

表 5

サンプル No	DNA 濃度 (ng/スポット)	液体シンチレーションカウンター 計測値	
		cpm/スポット	Δ cpm/スポット
1	20	912	897
2	10	485	470
3	2	110	95
4	1	63	48
5	0.2	25	10
6	0.1	20	5
7	0	15	0

表 6

病 名	10 μ l 血清/スポット における液体シンチレーションカウンター 測定値 (Δ cpm/スポット)	血清中DNA 濃度 (ng/ml)
すい臓癌	240	510
胃 癌	123	260
直腸癌	155	330
肺 癌	133	280
健 常 人	4	< 10

実施例 2 : ポリイノシン (poly(rI)) プロープ法によるDNA の検出

(A) ポリイノシン (poly(rI)) の5'-脱リン酸化 :

poly(dI)をpoly(rI)に代えた以外は実施例 1 の (A) 項と同様にして, poly(rI)の5'-位を脱リン酸化した。

(B) 5'-脱リン酸化ポリイノシン (poly(rI)) のラベル化 :

poly(dI)をpoly(rI)に代えた以外は実施例 1 の (B) 項と同様にして, 5'-脱リン酸化poly(rI)を

脱リン酸化, および(B) 5'-脱リン酸化ポリデオキシイノシン (poly(dI)) のラベル化は, 実施例 1 の(A) 項および(B) 項と同様にして行なった。

(C) RNA の抽出 :

6Mグアニジンイソチオシアネート, 5mM クエン酸ナトリウム, 0.1Mメルカプトエタノール, および 0.5%ラウリルサルコシル酸ナトリウム (Sarkosyl) を含有するグアニジンイソチオシアネート溶液を調整した。このグアニジンイソチオシアネート溶液にヒトの細胞 100~200 μ g (細胞数約 10^7 個) を溶解させ, さらにCsClを 0.4 g 加えて溶解させた。得られた溶液を, 5.7M CsCl-0.1M EDTA (pH 7.5) 溶液1mlを入れた遠沈管に加えて, 該CsCl-EDTA溶液上に積層させた。この遠沈管をスイングローターにセットし, 20 $^{\circ}$ C, 35,000rpm で一夜 (12~16時間) 超遠心分離を行なった。ヒト細胞由来のDNA や蛋白質はその比重に応じて溶液中に層を形成して浮遊し, RNA は遠沈管の底部にベレット状となって沈殿した。上清部を除去した後, ベレット状のRNA を4xSSC に溶解させて1 μ g /ml

ラベル化した。poly(rI)は1 μ g 当たり 9×10^4 cpm にラベル化された。

(C) DNA の検出 :

poly(dI)をpoly(rI)にかえた以外は実施例 1 の (C) 項と同様にして, DNA を検出した。その結果を表 7 に示す。表 6 の結果と比べ良い一致を示し, 癌患者の血清中のDNA 濃度は健常人に比べて明らかに高いことが判明した。

表 7

病 名	血清中DNA 濃度 (ng/ml)
すい臓癌	495
胃 癌	231
直腸癌	328
肺 癌	293
健 常 人	< 2

実施例 3 : ポリデオキシイノシン (poly(dI)) プロープ法によるRNA 濃度の測定

(A) ポリデオキシイノシン (poly(dI)) の5'-

の濃度のRNA 溶液を得た。

(D) RNA 濃度の測定 :

本実施例(C) 項で得られたRNA 溶液を 100 $^{\circ}$ Cで10分間煮沸して変性させたものを, 各々1 μ l, 2 μ l, 5 μ l, 10 μ l および20 μ l ずつニトロセルロースフィルター上に円形となるようにスポットした。(各々1, 2, 5, 10および20ng/スポットの量のRNA がスポットされた。) このフィルターを4xSSC 溶液で洗浄後風乾し, 80 $^{\circ}$ Cで2時間加熱乾燥させた。このフィルターと本実施例(B) 項で得られたラベル化poly(dI)プロープDNA とを用い, 実施例 1 (C) 項の方法に準じてハイブリダイゼーションを行い, 液体シンチレーションカウンターでラベル量を計測した。別に, 濃度既知の酵母RNA を用いてそのラベル量を同様の方法で測定し, 検量線を作成し, 上記5種類の濃度のRNA 濃度を算出した。

それぞれの結果を表 8 に示す。本実施例の方法で測定したRNA 濃度の値は紫外分光法で測定したRNA 濃度の値に良く一致し, 本発明方法により,

別の生物由来のRNAを検量線作成用に用いても、例えば、ヒトのRNA定量用に酵母のRNAを用いて検量線を作っても、RNAを精度良く検出、定量できることが明らかとなった。

表8

No.	DNA プロブ法による RNA 濃度 (ng/スポット)	紫外分光法による RNA 濃度 (ng/スポット)
1	0.89	1
2	1.78	2
3	4.90	5
4	10.1	10
5	19.8	20

実施例4：ポリイノシン (poly(rI)) プロブ法によるRNA濃度の測定

実施例2で得られた³²Pで 9×10^4 cpm/ μ gにラベル化されたpoly(rI)を用い、実施例3(c)項で得られたRNA溶液のRNA濃度を実施例3(d)項と同様にして測定した。その結果を表9に示す。表8の結果と比べ良い一致を示した。

を、実施例1の(b)項と同様の方法で、³²P-ATPを用いてラベル化した。なお、ラベル化オリゴデオキシイノシンの回収は、セファデクス G100ではなくセファデクス G50を用いて行なった。オリゴデオキシイノシン-30/50は10ng当たり 0.8 \times 10⁴cpmにラベル化された。

次いで、実施例3の(d)項と同じサンプルを用いて同様の方法でRNAの濃度を測定し、その結果を表10に示した。本実施例の方法で測定したRNA濃度の値は紫外分光法で測定したRNA濃度の値に良く一致し、本発明方法により、別の生物由来のRNAを検量線作成用に用いても、例えば、ヒトのRNA定量用に酵母のRNAを用いて検量線を作っても、RNAを精度良く検出、定量できることが明らかとなった。

(以下余白)

表9

No.	DNA プロブ法による RNA 濃度 (ng/スポット)	紫外分光法による RNA 濃度 (ng/スポット)
1	1.02	1
2	1.95	2
3	4.78	5
4	10.13	10
5	19.9	20

実施例5：オリゴデオキシイノシンプロブ法によるRNA濃度の測定

ポリデオキシイノシン (poly(dI)) 100 μ gを1mlのP1緩衝液 (50mM 酢酸アンモニウム緩衝液 (pH5.3) - 0.01mM 塩化亜鉛) に溶解し、スクレアーズP1を1ユニット加えて37℃で反応後、5分、10分、30分、および60分時点で、20 μ lずつサンプリングし、部分加水分解を行なった。得られた部分加水分解物をアクリルアミド電気泳動にかけ、30~50塩体の分子量の範囲を分画し、これをオリゴデオキシイノシン-30/50と命名した。

このオリゴデオキシイノシン-30/50の5'-位

表10

No.	DNA プロブ法による RNA 濃度 (ng/スポット)	紫外分光法による RNA 濃度 (ng/スポット)
1	0.83	1
2	1.71	2
3	4.68	5
4	9.88	10
5	19.7	20

実施例6：オリゴデオキシイノシンプロブ法によるRNA濃度の測定

完全保護デオキシイノシンモノマーを固相法トリエステルリン酸法により逐次縮合し、20塩体のオリゴデオキシイノシンを得た。5 pmolのオリゴデオキシイノシンを、実施例1の(b)項と同様の方法で、その5'-位に³²P-ATPでラベルを入れた。なお、ラベル化オリゴデオキシイノシンの回収は、セファデクスG100ではなく、セファデクスG25を用いて行なった。20塩体のオリゴデオキシイノシンは1 pmol当たり1.2 \times 10⁴cpmにラベル化された。

次いで、実施例 3 の (D) 項と同じサンプルを用いて同様の方法で RNA の濃度を測定し、その結果を表 11 に示した。本実施例の方法で測定した RNA 濃度の値は紫外分光法で測定した RNA 濃度の値に良く一致し、本発明方法により、別の生物由来の RNA を検量線作成用に用いても、例えば、ヒトの RNA 定量用に酵母の RNA を用いて検量線を作っても、RNA を精度良く検出、定量できることが明らかとなった。

表 11

No	DNA プロブ法による RNA 濃度 (ng/スポット)	紫外分光法による RNA 濃度 (ng/スポット)
1	0.91	1
2	1.83	2
3	4.98	5
4	10.12	10
5	20.25	20

実施例 7 : オリゴデオキシイノシンプロブ法による DNA の検出

実施例 5 で得られた 10ng 当たり 0.8×10^4 cpm にラ

を精度良く検出、定量でき、悪性腫瘍の有無の有効な判定基準となりうる。また、本発明方法により、RNA への DNA の転写効率、言い換えれば、遺伝子の発現効率を測定することができる。

プロブに用いられるポリマー DNA および/または RNA は、例えば、モノマーであるデオキシイノシンジホスフェートやイノシンジホスフェートをポリヌクレオチド フォスホリラーゼ等の酵素を用いて重合することにより、大量に生産せしめることが可能である。さらに、プロブに用いられるオリゴマー DNA および/または RNA は、上記ポリマー DNA および/または RNA をヌクレアーゼにより部分加水分解を行って得てもよいし、または、モノマーであるデオキシイノシンやイノシンの逐次縮合によりオリゴマーを合成しても得られる。特に後者の方法は、その分子量を厳密に既定できるため、有効である。ここで、プロブとしての有効性に対する分子量の影響は厳密には検討されてはいないが、そのことは本発明方法の意義を減少するものではない。

ベル化されたオリゴデオキシイノシン-30/50 を用い、実施例 1 (c) 項と同じサンプルおよび方法を用いて血清中 DNA の濃度を測定した。その結果を表 12 に示す。実施例 1 の場合と良い一致を示し、癌患者の血清中の DNA 濃度は健康人に比べて明らかに高いことが判明した。

表 12

病 名	血清中 DNA 濃度 (ng/ml)
すい臓癌	503
胃 癌	228
直 腸 癌	335
肺 癌	310
健 常 人	< 5

(発明の効果)

本発明方法によれば、このように、検体中の DNA および/または RNA を簡単な操作で精度良く検出、定量できる。特にポリイノシン、ポリデオキシイノシン、オリゴイノシン、オリゴデオキシイノシンをプロブとして利用すると、ヒト血清中の DNA

以上のごとく、検出試薬としてのプロブが容易にかつ安価に入手できるため、本発明方法による DNA および/または RNA の検出、定量は安価になされうる。

以 上

出願人 積水化学工業株式会社
代表者 廣 田 肇